

Valoración de metodologías de extracción de ADN a partir de tres tipos de muestras biológicas de equinos

Assessment of DNA extraction methodologies from three types of equine biological samples

Núñez Lorena¹, Araujo Alba¹, Giménez Guillermo¹, Florentín Ingrid², Narváez Lourdes¹, Rodríguez María Inés³, Martínez Roberto⁴

¹Universidad Nacional de Asunción - Facultad de Ciencias Veterinarias - Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades de los Animales Domésticos, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción - Facultad de Ciencias Veterinarias., Paraguay.

³Universidad Nacional de Asunción, Dirección de Investigación Científica y Tecnológica. Paraguay.

⁴Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigación Científica y Tecnológica. Paraguay.

RESUMEN. El objetivo de la investigación fue analizar cuatro métodos de extracción de ADN genómico (ADNg) empleando Kit de extracción comercial, Fenol cloroformo isoamílico, Chelex® y Proteinasa K, utilizando muestras de sangre entera, sangre impregnada en papel filtro y pelos procedentes de equinos, obteniendo en total sesenta muestras. Se determinó la calidad y cantidad del ADN a través de espectrofotometría. Tras verificar que la distribución de las observaciones no se ajustaron a la normal con el test de Kolmogorov – Smirnov, los datos se analizaron mediante estadística no paramétrica utilizando análisis inferencial mediante Kruskal Wallis. Los resultados demostraron variaciones para concentraciones y purezas; la mayor concentración se obtuvo con fenol cloroformo isoamílico a partir de sangre entera (120,36 ng/μL). Utilizando sangre entera y papel filtro, los promedios fueron más bajos, tanto para proteinasa K (15,71 ng/μL) como para fenol cloroformo isoamílico (29,90 ng/μL). Respecto a la pureza, los métodos Chelex®, fenol cloroformo isoamílico y proteinasa K presentaron mayores contaminaciones, mientras que, con Kit de extracción, los valores de pureza fueron óptimos para los tres tipos de muestras. Se logró la extracción de ADN genómico utilizando los cuatro protocolos, aunque resulta necesaria su validación con mayor número y diversidad de muestras.

Palabras clave: muestras, equinos, ADNg, extracción.

ABSTRACT. The objective of the research was to analyze four methods of extraction of genomic DNA (gDNA) using a commercial extraction kit, isoamyl phenol-chloroform, Chelex®, and Proteinase K, using samples of whole blood, blood-soaked in filter paper and hair from horses, obtaining a total of sixty samples. Quality and quantity of DNA were determined through spectrophotometry. After verifying that the distribution of the observations did not fit the normal with the Kolmogorov - Smirnov test, the data were analyzed by non-parametric statistics using inferential analysis using Kruskal Wallis. The results demonstrated variations in concentrations and purities; the highest concentration was obtained with isoamyl phenol-chloroform from whole blood (120.36 ng/μL). Using whole blood and filter paper, the means were lower, both for proteinase K (15.71 ng/μL) and for isoamyl phenol-chloroform (29.90 ng/μL). Regarding purity, the Chelex®, isoamyl phenol-chloroform, and proteinase K methods presented higher contaminations, while with the Extraction Kit, the purity values were optimal for the three types of samples. Genomic DNA extraction was achieved using the four protocols, although its validation with a greater number and diversity of samples is necessary.

Key words: samples, equine, gDNA, extraction.

Dirección para correspondencia: Dra. Lorena Núñez - Universidad Nacional de Asunción - Facultad de Ciencias Veterinarias - Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades de los Animales Domésticos, San Lorenzo. Paraguay.

E-mail: lnunez@vet.una.py

Recibido: 27 de marzo 2023 / **Aceptado:** 27 de mayo 2022

INTRODUCCIÓN

La toma de muestras biológicas, así como la extracción de material genético a partir de las mismas, comprenden la etapa inicial de casi todas las técnicas moleculares, siendo necesario ADN íntegro y puro, características fundamentales para el éxito en la obtención de datos genéticos confiables. El primer aislamiento de material genético fue hecho por el biólogo y médico suizo Friedrich Miescher en 1869; a partir de este suceso, los métodos de extracción han mejorado, tanto en la cantidad y calidad del ADN conseguido, como en la disminución del tiempo de obtención. El principio tras la extracción de ADN se basa en la lisis celular y liberación del material genético, extracción de lípidos y proteínas con solventes orgánicos, precipitación del material genético, lavado del ADN y finalmente la disolución del producto en soluciones que aseguren su preservación (1,2).

La elección del material biológico y el método de extracción son cruciales para asegurar la óptima cantidad y calidad del ADN aislado de modo a realizar las aplicaciones posteriores; existen varios factores que podrían influir en el aislamiento del material genético, tales como el tiempo, el costo, la toxicidad de los elementos, el equipamiento laboratorial y la experiencia del operador (3). Es por esto, que el presente trabajo evaluó cuatro métodos de extracción de ADN genómico (ADNg) en base a los protocolos Chelex®, Proteinasa K, método fenol cloroformo y extracción empleando kit comercial a partir de sangre entera, sangre impregnada en papel filtro y pelos obtenidos de animales de la especie equina, con el fin de determinar la mejor muestra biológica y método que cumpla con las mejores condiciones de aplicación y eficiencia para la extracción de material genético de concentraciones necesarias para su posterior empleo en distintas técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 5 animales de la especie equina pertenecientes a una granja dedicada a la cría de animales para auto sustento, localizada en la ciudad de Asunción, departamento Central. Las muestras fueron colectadas previa autorización del propietario.

De cada animal se obtuvieron muestras de sangre fresca, pelo y sangre depositada en papel

filtro, destinadas a la extracción de ADN por cada método, conformando un total de sesenta unidades observacionales (4). La muestra de sangre fue extraída mediante punción de la vena yugular, y depositada en tubos con EDTA, inmediatamente se realizó la refrigeración del mismo para su posterior envío al laboratorio. Las muestras de pelo se obtuvieron de manera aleatoria de la cola, incluyendo el bulbo piloso, aproximadamente 30 pelos por equino. Por último, la sangre fue extraída en una cantidad mínima suficiente para ser depositada como gotas en el papel filtro S&S 903 que permite coleccionar las muestras en campo y transportarlas a temperatura ambiente a largas distancias.

Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre impregnada en papel filtro, pelo y sangre entera con EDTA (previa descongelación de esta última muestra).

Método kit de Extracción

Se utilizó el Kit de Extracción Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trabajó a partir de 150 µL de sangre entera, 5 pelos y/o de 1 cm² de papel filtro impregnado de sangre.

Método fenol cloroformo isoamílico

Se utilizó la metodología adaptada para muestras de sangre entera, pelo y sangre impregnada en papel filtro descrita por Vázquez (5), disponiendo 150 µL de sangre entera, 3 pelos y/o 1 cm² de papel filtro impregnado de sangre en un tubo de 1,5 mL. Seguidamente se agregó 500 µL de buffer de lisis. Luego, 25 µL de proteinasa K y 25 µL de Tween 20. Posteriormente, el material fue llevado a un agitador vórtex por 1 minuto. La muestra fue incubada durante 360 minutos a 50 °C y nuevamente agitada en vórtice durante 1 minuto. Seguidamente, se centrifugó 10 minutos a máxima velocidad. Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 25 µL de proteinasa K y 25 µL de Tween 20. Luego se incubó durante 60 minutos a 65°C, elevándose luego la temperatura a 90°C e incubando la muestra durante 10 minutos. A continuación, se agregó 1 volumen de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1). El material fue llevado al agitador vórtex durante 1 minuto y centrifugado por 10 minutos a máxima velocidad. Se pasó la fase acuosa a un nuevo tubo y se agregó 1

volumen de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1). Se realizó una mezcla por inversión centrifugándola durante 10 minutos a máxima velocidad. Posteriormente, se pasó la fase acuosa a un nuevo tubo, se agregó 1 volumen de isopropanol y 1/10 de NaCl 10 %. Luego, se procedió a mezclar por inversión, incubándose por 30 minutos a -20 °C y centrifugando 10 minutos a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y se agregó 300 µL de etanol 70% centrifugando durante 8 minutos a máxima velocidad. Luego de descartar el sobrenadante se dejó secar el precipitado a 37 °C. Finalmente, se re suspendió en 50 µL de agua ultra pura.

Método resina quelante Chelex® 100

Se utilizó la técnica para muestras en papel filtro descrita por Del Puerto (6), impregnando la gota de sangre en el papel cortando y colocando en un tubo de 1,5 mL con 1 mL de agua bidestilada, dejando reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, luego centrifugando por 3 minutos a 13000 revoluciones por minuto (rpm), descartando el sobrenadante y añadiendo 150 µL de Chelex® 100 al 5%, posteriormente, se incubó a 56°C por 30 minutos, agitando con vórtex por 10 segundos hirviendo 10 minutos, agitando nuevamente por 10 segundos y centrifugando por 3 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante estuvo listo como plantilla para la cPCR (Reacción en cadena de la polimeras convencional), y se guardaron inmediatamente a -20°C.

La técnica adaptada para muestras de sangre entera descrita por Ascencio (7), fue utilizada colocando 50 µL de sangre con 500 µL de TE (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 8), centrifugando a 11000 rpm durante 10 segundos, descartando posteriormente el sobrenadante procurando no perder el precipitado. Se repitieron los tres primeros pasos hasta que el precipitado quedo limpio. Luego se agregó 100 µL de la preparación obtenida a partir de 1000 µL agua molecular, 50 mg de Chelex® 100 y 1 mg de Proteinasa K. Posteriormente se incubó a 56°C durante 50 minutos y 95°C durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se guardaron inmediatamente a -20°C.

La técnica adaptada para muestras de pelo descrita por Walsh (8), fue utilizada seleccionando tres pelos por muestra de animal para ser colocados en cada microtubo. Para ello se procedió al corte de 3-

4 cm desde la raíz (con el bulbo) hacia arriba y mezclada con 1000 µL de agua destilada. Luego se colocó en el bloque térmico a 70°C durante 3 minutos, centrifugando a 14000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, fue removido el sobrenadante dejando aproximadamente 30 µL del volumen obtenido anteriormente. Se agregó 200 µL de Chelex® 100 al 5% y se incubó 30 minutos a 56°C. Las muestras se mezclaron utilizando el agitador vórtex por 5 segundos, realizando luego una incubación final de 8 minutos en agua hirviendo. El sobrenadante estuvo listo como plantilla para la cPCR, y se guardaron inmediatamente a -20°C.

Método Proteinasa K

La técnica adaptada para muestras de sangre descrita por Martínez (9), fue utilizada mezclando 50µL de sangre total con 500 µL de TE, para luego centrifugar a 11000 rpm durante 10 segundos. Se retiró el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 500 µL de TE; posteriormente, fue centrifugado a 11000 rpm 10 segundos, repitiéndose los dos pasos anteriores dos veces. Se retiró el sobrenadante del último lavado y se resuspendió el precipitado en 100 µL de tampón. Se procedió a la incubación a 56°C durante 45 minutos; luego se elevó la temperatura a 95 °C incubando durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se diluyeron 1:2 con TE, para conservarse inmediatamente a -20 °C.

La técnica adaptada para muestras de sangre en papel filtro y pelo descrita por Martínez (9) se utilizó transfiriendo pelos y aproximadamente 1 cm² de papel filtro impregnado de sangre a cada tubo de 1,5 mL, en cada uno de ellos se añadió 100 µL de tampón K, incubando a 56°C durante 45 minutos y luego a 95°C durante 10 minutos. Las muestras fueron conservadas a -20 °C

Integridad y cuantificación del ADN

El proceso de cuantificación se realizó por medio de espectrofotometría. Utilizando el NanoDrop (espectrofotómetro ND-1000), se cuantificó cada una de las 60 muestras evaluadas por triplicado y se determinó el valor promedio de la concentración y pureza de ADN de cada una de las muestras.

Mediante la amplificación por cPCR, se verificó la integridad del ADN. Se utilizó el gen 12S, específico para equinos y los siguientes pares de

cebadores: forward 5'-ACAAAGCTATTCGCCAGAGT-3 y reverse 5'-ACTTTCGTCCGGTTAAAGT-3', los que generan una banda de 292 pb. La amplificación fue llevada a cabo en el termociclador 1000 Thermal Cycler, Biorad®, mediante un programa térmico, conllevando una primera etapa a 94°C durante 1 minuto, seguido de 25 ciclos que comprendían, una primera fase de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, una fase de hibridación a 54°C durante 1 minuto y una fase de extensión de la cadena a 72°C durante 1 minuto. El programa térmico finalizó con una extensión a 72°C durante 5 minutos. Para la mezcla de reacción se utilizó un volumen total de 25 µL. Empleándose Taq 0,125 µL, Buffer 5x 5 µL, DNTs 0,5 µL, Primer F 1,9 µL, Primer R 1,9 µL, Agua molecular 10,9 µL.

Electroforesis

Los productos de la PCR fueron posteriormente detectados mediante geles electroforéticos de agarosa al 1,5%, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante del ADN. Es importante destacar que cada etapa del procedimiento (extracción de muestras de sangre, amplificación, carga de ADN y electroforesis) fue realizada en salas separadas. Como control positivo de la PCR se utilizó una muestra de ADN de equino. Mientras que, para el control negativo de la reacción, se sometió a la PCR una muestra con agua ultra pura libre de nucleasas (Thermo Scientific®), en lugar de ADN, así se verificó que no exista contaminación de los reactivos utilizados en la técnica.

Diseño y análisis estadísticos

En relación con el procesamiento de los datos colectados, se formó un banco de datos en planillas Excel. Fueron determinadas medidas de resumen de la concentración de (ng/µL) de ADN obtenido a partir de diferentes materiales biológicos, procesados mediante cuatro métodos de extracción, análisis de frecuencia en las diferentes categorías para la evaluación de pureza de ADN, según la absorbancia 260/280.

La distribución teórica de las observaciones se verificó con el test de Kolmogorov-Smirnov utilizando la corrección de Lilliefors, aplicando para el análisis inferencial, el test de Kruskal Wallis.

Los datos fueron procesados con el software R(10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados en cuanto a la distribución de las observaciones referentes a la concentración de ADN genómico obtenido a partir de los tres tipos de muestras en equinos son expuestos en la tabla 1; al respecto, las mismas no se ajustaron a una distribución normal.

Tabla 1. Resultados de la prueba de normalidad de la variable concentración de ADN, obtenidos a través del test Kolmogorov-Smirnov utilizando la corrección de Lilliefors

Variable	Estadístico	n	P-valor
Concentración ng/µL	0,2458	60	0,0000000009916

ng= nanogramos; µL= microlitros; n=muestra

Respecto a las medidas de resumen son expuestas en la Tabla 2; las mismas revelaron que, mediante el método de extracción Chelex®, el promedio de concentración de ADN más elevado se obtuvo a partir de sangre entera (71,04 ng/µL), correspondiendo la menor concentración a la muestra de papel filtro (33,98 ng/µL). Similar comportamiento se observó al valorar la concentración de ADN obtenida por el método de extracción con fenol cloroformo, que evidenció un valor promedio superior en la muestra sangre entera (120,36 ng/µL), y el promedio inferior con el material biológico papel filtro (29,90 ng/µL).

Tabla 2. Resumen de la concentración (ng/µL) de ADN obtenido a partir de diferentes materiales biológicos, procesados mediante cuatro métodos de extracción.

Método	Materiales	N	\bar{x}	$\pm DE$
Chelex®	Papel Filtro		33,98	2,57
	Sangre Entera	15	71,04	28,41
	Pelo		37,11	5,10
Proteinasas K	Papel Filtro		23,82	3,59
	Sangre Entera	15	15,71	3,12
	Pelo		112,77	34,14
Kit de extracción	Papel Filtro		37,05	4,04
	Sangre Entera	15	90,45	96,46
	Pelo		35,88	6,44
Fenol Cloroformo	Papel Filtro		29,90	15,00
	Sangre Entera	15	120,36	68,18
	Pelo		49,75	8,21

De igual manera, los valores obtenidos con el método de extracción Kit comercial, demostraron que el valor más elevado correspondió al material

biológico sangre entera (90,45 ng/μL), mientras que, el promedio inferior se observó en la muestra de pelos (35,88 ng/μL).

Contrariamente, la aplicación del protocolo de extracción proteinasa K, arrojó el valor más bajo de concentración con sangre entera (15,71 ng/μL); mientras que, el más elevado correspondió a pelos (112,77 ng/μL). Cabe destacar que, los valores de concentración registrados para los métodos de extracción a partir de Chelex® y proteinasa K fueron similares a lo mencionado por diversos autores (5, 11,12).

Sin embargo, los valores obtenidos a partir del método Fenol cloroformo fueron bastante inferiores, comparado con lo reportado por otro autor (13).

Con respecto a la muestra sangre entera, es importante acotar que la cantidad de glóbulos blancos/leucocitos en la sangre es muy variable entre las muestras. Existe una variación intraindividual conocida como variabilidad fisiológica. Este tipo de variabilidad puede ser estimulada por factores como la dieta, la medicación, la infección o la actividad. Esto puede causar un aumento o una disminución en la concentración de glóbulos blancos en el torrente sanguíneo, lo que causa diferencias en la

concentración o el rendimiento del ADN extraído de estas células (14).

Si bien, algunas muestras evidenciaron valores de concentración más altas en comparación a otras, es importante acotar que se encontraron dentro de límites aceptables para amplificación, teniendo en cuenta que el promedio normalmente es de 20 ng/μL (15) en un rango de 70 a 100 ng/μL (11).

Mediante espectrofotometría, se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADN basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1,8-2,0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1,6. Un valor A260/280 <1,6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio A260/280 > 2,1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra (16). Teniendo en cuenta lo expuesto, el grafico de la Figura 1, representa la distribución de la pureza de ADN en equinos utilizando tres materiales biológicos y cuatro métodos

Se observa mayor similitud entre los cuatro métodos de extracción, considerando el material biológico pelo; puesto que la mayor cantidad de

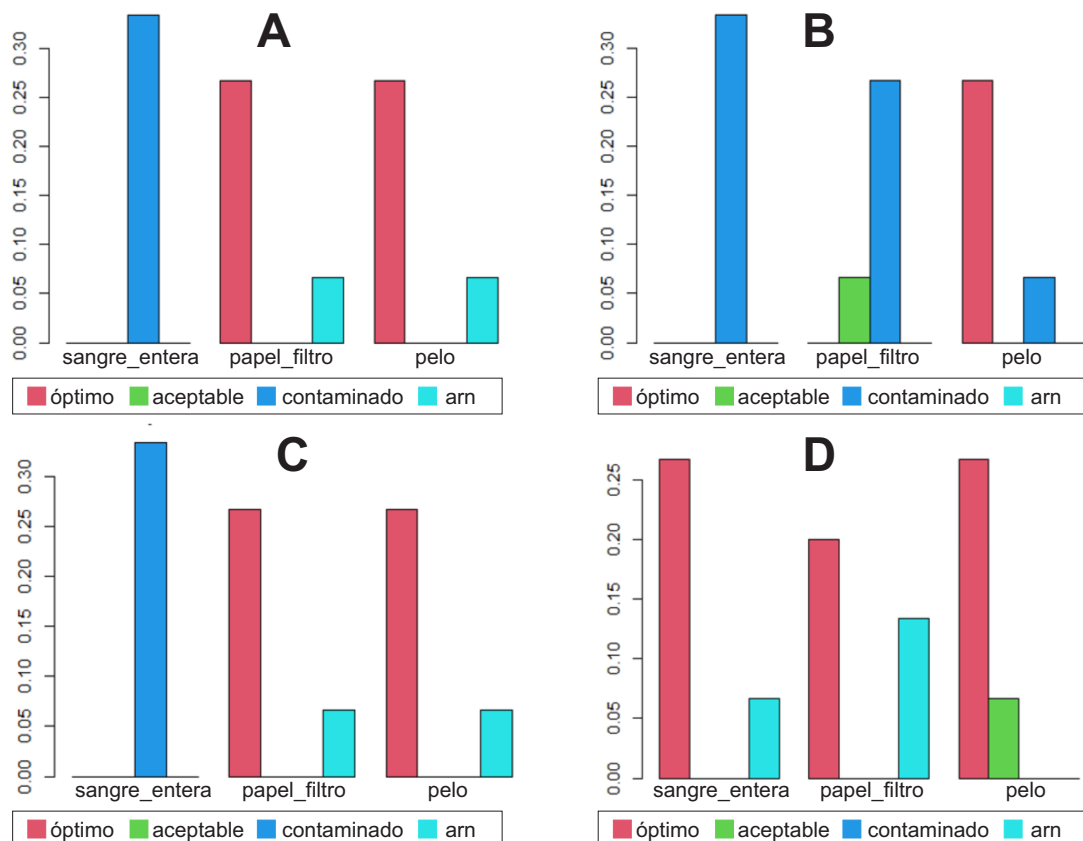


Figura 1. Comparación de la pureza en muestras biológicas procesadas con Chélex® (A); con fenol cloroformo (B); proteinasa K (C) y Kit comercial (D)

unidades observacionales se encuentran en el grupo que corresponde a pureza óptima. Por su parte, lo que se refiere a la muestra papel filtro podemos acotar que los protocolos Chelex® y proteinasa K fueron los que arrojaron mejores valores de pureza, ya que fue evidenciado ADN íntegro en mayor medida y presencia de ARN en menor cantidad.

De igual manera, fue notable que la sangre entera, tanto para el método de extracción Chelex®, fenol cloroformo y proteinasa K, la mayoría de las muestras se situaron en el grupo que corresponde a pureza contaminada. Sobre este último método, es importante acotar que, tratándose de métodos fenólicos de desproteinización, la presencia de proteínas en los extractos para la obtención de ADN es un indicador de deficiencia del procedimiento (17); sin embargo, de manera general, se puede señalar que se obtuvieron en la mayoría de los métodos de extracción buena eficiencia a la hora de la determinación de la A260/280.

Los resultados del análisis inferencial, se exponen en la Tabla 3. En ese sentido, las medias de los rangos de los tratamientos, entendidos en este caso como protocolos de extracción y muestras biológicas utilizadas, revelaron diferencias significativas.

Tabla 3. Comparación de la media de los rangos de concentración de ADN utilizando diferentes materiales y métodos de extracción.

Pureza	Método	Medias de rangos
Contaminado	papel_filtro:fenol_cloroformo	3,00 _a
Contaminado	pelo:fenol_cloroformo	5,00 _{ab}
Contaminado	sangre_entera:chelex	8,40 _{ab}
Contaminado	sangre_entera:fenol_cloroformo	12,20 _b
Óptimo	sangre_entera:proteinasa	2,33 _a
Óptimo	papel_filtro:proteinasa	7,60 _{ab}
Óptimo	papel_filtro:chelex	15,38 _{abc}
Óptimo	pelo:chelex	17,88 _{bcd}
Óptimo	sangre_entera:Kit_comercia..	19,50 _{bcd}
Óptimo	pelo:Kit_comercial	19,63 _{bcd}
Óptimo	papel_filtro:Kit_comercial..	21,17 _{bcd}
Óptimo	pelo:fenol_cloroformo	25,75 _{cd}
Óptimo	pelo:proteinasa	31,33 _d

El análisis reveló por una parte que, en muestras de pureza aceptable la concentración utilizando material biológico y métodos de extracción diferentes no fue significativa, puesto que el p valor fue de 0,5. Por su parte, en las muestras de pureza con ARN aconteció lo mismo, es decir, la concentración utilizando material biológico y

métodos de extracción no fue significativa, ya que el p valor fue de 0,0952.

Sin embargo, al analizar las muestras de pureza contaminada, se detectaron diferencias significativas entre algunas muestras, tal es el caso del papel filtro mediante el método fenol cloroformo que fue significativamente diferente a muestras de sangre entera con el método fenol cloroformo (29,90 ng/μL vs 120,36 ng/μL).

Es importante acotar, que a pesar de exhibir pureza contaminada y presentando una concentración relativa alta, se puede apreciar la presencia de bandas como se observa en la Figura 2.

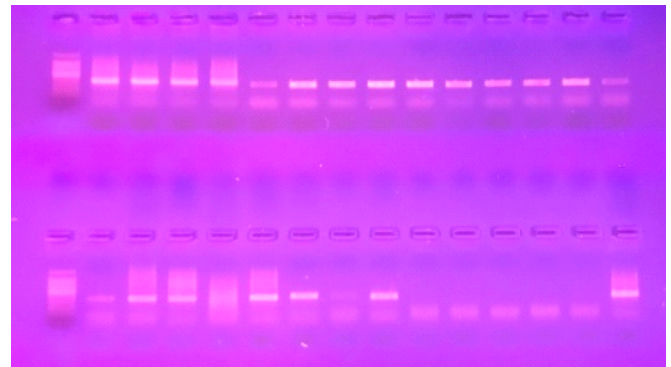


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. **Hilera superior:** pocillos 2 al 6 ADN extraído de pelo mediante proteinasa K, pocillos 7 al 11; ADN extraído de sangre entera mediante Proteinasa K, 12 al 15; ADN extraído de papel filtro mediante proteinasa. **Hilera inferior:** 2 al 6; ADN extraído de sangre entera mediante Chelex®, 7 al 11; ADN extraído de Papel filtro mediante Chelex®, 12 al 15; ADN extraído de pelo mediante Chelex®. **Carriles 1:** Marcador de peso molecular.

Se puede visualizar en la misma tabla las muestras con pureza óptima, y en ella se han detectado diferencias significativas entre algunas muestras, tal como se observa con la sangre entera mediante el método proteinasa K que fue significativamente diferente de la muestra pelo sometida al mismo protocolo de extracción (15,71 ng/μL vs 112,77 ng/μL).

Finalmente, en la figura 2, se observan los productos de amplificación de la cPCR analizados en gel de agarosa al 1,5%, para un fragmento de 292 pb. Los controles negativos en cada reacción se presentaron limpios (ausencia de bandas). En la hilera superior, se visualizan las bandas del ADN correspondiente a sangre entera y papel filtro para el método de extracción con proteinasa K, las mismas se presentaron íntegras e intactas. Sin embargo, para las muestras pelo, se observan bandas ligeramente fragmentadas, excepto en una muestra (7); la presencia de estas bandas degradadas

probablemente se deba al exceso de concentración de ADN como se visualizó anteriormente, pudiendo haber interferido con la amplificación en la cPCR.

El método de Chelex® (Figura 2), mostró bandas fragmentadas para el ADN extraído a partir de sangre entera; mientras que la mayoría de las correspondientes a papel filtro y pelo mostraron ausencia de bandas en el gel. Estos inconvenientes pudieron deberse a la coincidencia de la presencia de contaminación con ARN, además pudiendo responder a una elevada contaminación proteica.

Con respecto al método de Kit de extracción y fenol cloroformo isoamílico (Figura 3), la mayoría de las bandas se mostraron integras e intactas.

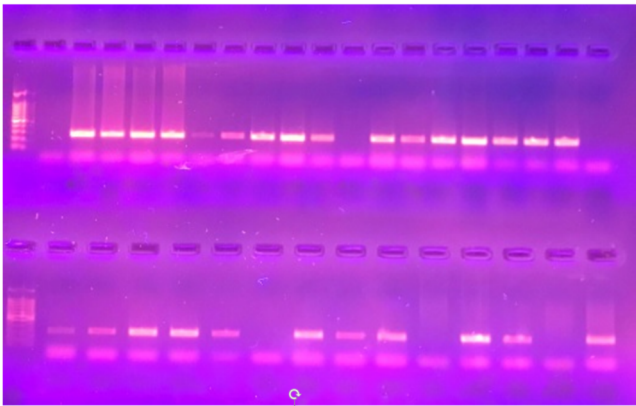


Figura 3. Hilera superior: pocillos 3 al 7 ADN extraído de sangre entera mediante Kit Wisard, pocillos 8 al 12; ADN extraído de pelo mediante Kit de extracción, 13 al 19; ADN extraído de papel filtro mediante Kit de extracción. **Hilera inferior:** ADN extraído mediante el método Fenol cloroformo a partir de muestras de; 2 al 6; pelo, 7 al 11; sangre entera, 12 al 15; ADN papel filtro. **Carriles 1:** Marcador de peso molecular.

En líneas generales podemos observar mediante las Figuras 2 y 3, que todos los métodos de extracción fueron eficientes y adecuados para los tres tipos de materiales biológicos, a pesar de presentar varias muestras con purzas contaminadas y aceptables, puesto como se visualiza en los resultados de la amplificación de la cPCR, existen bandas ubicadas en diferentes carriles a un nivel de 292 pb, lo que confirma que la aplicación de los métodos de extracción no presentaron básicamente alguna dificultad técnica. Varios autores (18, 19) mencionan que una técnica que permite extraer el ADN de un medio que contenga contaminantes, es mucho más prometedora que un método que busque extraer los contaminantes de la preparación. El extraer ADN con un protocolo o método adecuado minimiza los problemas de contaminación, puesto que, no se requiere extraer todo el ADN allí presente,

sino obtenerlo en una cantidad y calidad suficiente, sobre todo, cuando éste va a ser utilizado para pruebas moleculares. La remoción de los contaminantes del extracto es usualmente una tarea difícil que con frecuencia lleva a la inhibición de las reacciones o errores en la amplificación (19).

CONCLUSIONES

Para la especie equina, todos los métodos fueron eficientes en líneas generales para los tres materiales biológicos, destacándose el Kit comercial y el de proteinasa K.

El aporte de esta investigación, fue la identificación de metodologías eficaces, fiables, de fácil aplicación y reproducibilidad en cualquier laboratorio.

En ese sentido, los métodos proteinasa K y Chelex®, reunieron las condiciones citadas al constituirse como los métodos de extracción más eficientes para la mayoría de las muestras biológicas estudiadas, además de ser métodos de extracción sencillos y rápidos. Por otra parte, es importante recalcar que ambos métodos de extracción tienen la ventaja de no generar residuos tóxicos ni efectos adversos para los operarios, como sería el caso de las técnicas que emplean solventes orgánicos.

AGRADECIMIENTOS.

A la división del Laboratorio de Biotecnología Animal del Departamento de Clinicas Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias – UNA, que permitió la realización de este trabajo en sus instalaciones. El proyecto PINV15-040 fue financiado por el CONAYT a través del programa PROCENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación e Investigación - FEEI.

BIBLIOGRAFÍA

1. Loredó, E.. ADN Historia de la molécula de la vida. HISTOMED. (Cuba). 2022.
2. Sandoval, A. Extracción de ácidos nucleicos. Acc. Med.. 2023; McGraw-Hill. 1-15.
3. Dairawan, M. the evolution of DNA extraction Methods. AJBSR. 2020; 8(1): 39- 45.
4. Núñez L, Evaluación y comparación de dos protocolos de extracción de ADN a partir de tres tipos de muestras de ovinos. Compend. Cienc. Vet. 2021; (2): 18-23.

5. Vásquez M. Comparación de 5 métodos de extracción genómico de sangre. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. 2019. UDLA. 63 p.
6. Del Puerto F, Pésole D, Molina S, Vera K, Arias M, Sosa J, Ortiz M, Fernández J, Garay A. Identificación molecular del sexo en 9 especies de aves del Centro de Investigación en Animales Silvestres de la hidroeléctrica de ITAIPU, lado paraguayo. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 2017. 15(3), 89-92. [https://dx.doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2017.015\(03\)89-092](https://dx.doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2017.015(03)89-092)
7. Ascencio M, Florín M, Schnittger L, Rodríguez A. Aplicación de un método de extracción de ADN a partir de sangre canina sensible y de bajo costo para el diagnóstico molecular de *Leishmania* sp. Argentina. *Revista de investigaciones científicas de la Universidad de Morón*. 2017. 1(1): 11-19. <https://doi.org/10.34073/15>
8. Walsh P, Metzger D, Higuchi R. *Bio Techniques*. 1991. 10:506
9. Martínez A. Caracterización genética del cerdo ibérico mediante marcadores moleculares. Tesis de Doctorado. Córdoba: Univ. de Córdoba-España. 178 p.
10. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2020
11. Villalobos A, González R. Rendimiento de protocolo de extracción de ADN de bovinos criollos. *Ciencia agropecuaria*. 2016. 25: 108 – 117
12. Cervantes J. Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. *Rev. Med. Hered*. 2003. 14 (4): 230-233
13. Lopera N, Povh J, Ribeiro R, Gomes P, Jacometo C, Da Silva T. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Rev. Ciencia e Investigación Agraria*. 2008. 35 (1): 77-86. doi:10.4067/S0718-16202008000100008
14. Graziano, L., El-Mogy, M., & Haj-Ahmad, Y. Genomic DNA /solation from Buffy Coat using Norgen's Blood Genomic DNA Isolation Mini Kit. Recuperado de www.norgenbiotek.com. 2013.
15. Landi V. 2007. *Differenziazione genética e dinamiche di popolazione nel merino europeo*. Tesis Doctorado Investigador en Ciencias Zootecnicas. Perugia: Università Degli Studi Di perugia. 180 p.
16. Bancoadn.org, Programa de control de calidad de muestras [sede Web]. Salamanca: bancoadn.org [actualizado el 2 de Octubre de 2020; acceso el 23 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.bancoadn.org>.
17. Maniatis, T., E.F. Fritsch. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab, New York. 1982. 468.
18. Cattaneo, C.; O. J. Craig and N. R. Sokol. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene frequencies. *J. Forensic Sci*. 1997. 42: 1126-1135.
19. Buttlar, J. *Forensic DNA Typing; Biology and Technology behind STR Markers*. Academic, California, USA. 2001. 322 p.